

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07236499 A**

(43) Date of publication of application: **12 . 09 . 95**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68
C12Q 1/70

(21) Application number: **06055046**

(22) Date of filing: **01 . 03 . 94**

(71) Applicant: **SUMITOMO METAL IND LTD**

(72) Inventor: **KOBAYASHI SATSUKI**
KOSHIZAKA TAKUYA

(54) **KIT FOR EXTRACTING VIRAL NUCLEIC ACID
FROM BLOOD COMPONENT AND EXTRACTION
OF VIRAL NUCLEIC ACID USING THE REAGENT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a kit enabling the extraction of viral nucleic acid from blood in a short time at a low cost and containing a proteinase, a specimen dilution liquid consisting of an aqueous solution of a reducing agent, etc., and having weakly acidic to weakly alkaline pH, a salt, a coprecipitation agent and an agent for the denaturation and dissolution of protein.

CONSTITUTION: This reagent kit for extracting a viral nucleic acid from a blood component is produced by combining (A) a proteinase, (B) a specimen dilution liquid consisting of an aqueous solution of at least one

kind of substances selected from a reducing agent, a surfactant, a chelating agent, a protein denaturation agent, etc., and having weakly acidic to weakly alkaline pH, (C) a salt and a coprecipitation agent and (D) an agent for the denaturation and dissolution of protein. A viral nucleic acid can easily be extracted using the reagent kit by adding the components A and B and, as necessary, the component C to a blood component, incubating the mixture to effect the decomposition and denaturation of the protein in the blood component and the protein originated from virus, solubilizing the proteins by adding the component D and finally adding a lower alcohol to the solution as it is to effect the alcoholic precipitation of the nucleic acid.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-236499

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/68	Z	9453-4B	
	1/70		9453-4B	

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平6-55046

(22)出願日 平成6年(1994)3月1日

(71)出願人 000002118
住友金属工業株式会社
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
(72)発明者 小林 五月
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
住友金属工業株式会社内
(72)発明者 越坂 卓也
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
住友金属工業株式会社内
(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54)【発明の名称】 血液成分からのウイルス核酸抽出キットおよび該試薬を用いるウイルス核酸抽出方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 短時間で、経済的に、コンタミネーションの危険性を低減することのできるウイルス核酸の抽出キットおよび抽出方法を提供する。

【構成】 a) 血液成分にタンパク質分解酵素、検体希釈液、ならびに場合により塩および共沈剤を含む試薬を加えインキュベートすることにより血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を分解、変性する；

b) さらにタンパク質変性溶解剤を加えて血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を可溶化する；

c) 有機溶媒による核酸抽出を行わずに、操作a) で塩および共沈剤を加えていない場合にはこの段階で両者を加え、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる血液成分からの核酸の抽出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の試薬：

(1) タンパク質分解酵素(2)還元剤、界面活性剤、キレート剤、タンパク質変性剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性である検体希釈液、(3)塩および共沈剤(4)タンパク質変性溶解剤、を組み合わせる血液成分からのウイルス核酸抽出試薬キット。

【請求項2】 タンパク質分解酵素がプロテイナーゼK、プロナーゼおよびズブチリシンから選択される請求項1に記載の試薬キット。

【請求項3】 還元剤が2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールである請求項1に記載の試薬キット。

【請求項4】 界面活性剤がラウリル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウム、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40)およびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20)から選択される請求項1に記載の試薬キット。

【請求項5】 キレート剤が二価の金属イオンをキレートしうる能力を有するものである請求項1に記載の試薬キット。

【請求項6】 塩が塩化ナトリウム、塩化カリウムおよび酢酸ナトリウムから選択される請求項1に記載の試薬キット。

【請求項7】 共沈剤がデキストランまたはグリコーゲンである請求項1に記載の試薬キット。

【請求項8】 タンパク質変性溶解剤がグアニジン塩酸、グアニジンチオシアン酸およびグアニジン硫酸から選択される請求項1に記載の試薬キット。

【請求項9】 以下の操作：

a) 血液成分にタンパク質分解酵素、検体希釈液、ならびに場合により塩および共沈剤を含む試薬を加えてインキュベートすることにより血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を分解、変性する；

b) さらにタンパク質変性溶解剤を加えて血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を可溶化する；そして

c) 有機溶媒による核酸抽出を行わずに、操作a)で塩および共沈剤を加えていない場合にはこの段階で両者を加え、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる血液成分からの核酸の抽出方法。

【請求項10】 上記操作a)からc)までを1本のチューブ内で実施する請求項9に記載の方法。

【請求項11】 上記操作a)の試薬を添加して攪拌した後55℃前後で15分間以上インキュベートを行い、かつ場合により操作b)のタンパク質変性溶解剤を添加

して攪拌した後55℃前後で1分間以上インキュベートを行う、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ウイルスの核酸(DNA、RNA)を材料として使用する遺伝子工学、生化学、臨床検査などのバイオテクノロジーの分野に有用な血液成分からのウイルス核酸の抽出試薬キットおよび該試薬キットを用いるウイルス核酸抽出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血液成分(血清、血漿)からウイルス粒子中の核酸(ウイルスゲノム)を抽出するには、グアニジンチオシアン酸塩を用いたChomczynskiらの方法(Analytical Biochemistry 162:156-159, 1987)もしくはその変法などが最も普及しており、従来法はおおよそ次の3段階から構成されている。

1. 血液成分(血清、血漿)などのタンパク質およびウイルス構成タンパク質などの分解変性ならびに可溶化処理

タンパク質分解変性ならびに可溶化の処理は、非特異的タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼK、プロナーゼ、ズブチリシンなどによる加水分解による方法、グアニジン塩酸、グアニジンチオシアン酸塩などのカオトロップ剤での変性による方法、ラウリル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウムなどのイオン性界面活性剤、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40)およびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20)などの中性界面活性剤によるタンパク質可溶化方法、アルカリ変性による方法、煮沸による方法などがある。

【0003】これらの方法は単独使用でもよいが、2種以上併用することによりさらに分解変性、可溶化の効率を高めることもできる。また上記処理段階において、尿素もしくはチオール系還元剤である2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどを添加することによりタンパク質の分解変性処理の効率を高めることもできる。

2. 有機溶媒による抽出処理

タンパク質分解処理後はフェノール、クロロホルム、フェノール-クロロホルムなどにより除タンパクの意味での有機溶媒抽出を行う。この処理は、試料由来のタンパク質および精製過程で添加したタンパク質分解酵素などを変性、分解除去でき、上層の水相を別の容器に分取することにより核酸成分が抽出できる。また、水相と有機相の界面を明確にする目的で1/10～1/30程度のイソアミルアルコールを含む有機溶媒に添加して抽出することもできる。

3. アルコール沈殿

アルコール沈殿は溶液中の核酸の濃縮、塩の除去およびフェノールなどの有機溶媒の混在物の除去のために行われる。通常、200~500mM程度の塩化ナトリウムもしくは酢酸ナトリウムを添加後、エタノールを2~3倍量またはイソプロパノールを等量加えて高速遠心することにより核酸を沈殿として回収することができる。

【0004】このアルコール沈殿の際、検体試料中の核酸量は極めて微量であることが多く、通常のアルコール沈殿では回収できない場合が生じてくるため共沈剤を添加することが好ましい。グリコーゲン、トランスファーRNAなどを適量添加して共沈させることにより微量の核酸の回収効率を高めることができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このような従来の方法では、有機溶媒による抽出もしくはそれに代わる何らかの方法による核酸成分の分離（容器の移し変え）が必要となる。このため最低チューブが2本以上必要となり、チューブの蓋の開け閉めの回数も多くなり、抽出操作が煩雑となり、抽出される核酸の定量性が失われてしまう可能性が高まる。そのうえ、この分離操作の際に、汚染（コンタミネーション）の危険性も生じてくる。またこれらの有機溶媒の使用は危険で人体に有害であるばかりでなく、その廃棄にも考慮が必要であるという欠点を有している。

【0006】そこで、本発明は①90分程度の短時間の簡単な操作で従来の方法と同等以上の高収率、高純度のウイルス由来の核酸を抽出できる、②操作過程でチューブ間の移し変え作業がなく、1本のチューブで実施できるので、臨床分野で利用する際の汚染（コンタミネーション）を防ぐことができる、③抽出過程で用いたチューブのまま逆転写反応など実験の次に段階へ進むことができる、④使用チューブ数が少なく、使用試薬も比較的安価なので経済的である、⑤フェノール、クロロホルムまたはその混合物など危険で人体に有害な有機溶媒を使用しない、などの利点を有する新規な血液成分からのウイルス核酸抽出試薬キットおよび該試薬キットを用いるウイルス核酸抽出方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、血清、血漿などの血液成分に含まれるウイルス中から核酸を、本発明の試薬キットの各試薬の用量および濃度を工夫することにより、簡易にしかも1本のチューブで、再現性よく定量的に抽出しうることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】本発明は、以下の試薬：

(1) タンパク質分解酵素 (2) 還元剤、界面活性剤、キレート剤、タンパク質変性剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性である検体希釈液、(3) 塩および共沈剤 (4) タンパク質変性溶解剤、を組み合わせる

血液成分からのウイルス核酸抽出試薬キットを提供する。本発明の試薬キットは上記(1)~(4)の試薬を含むが、このうち(2)の検体希釈液と(3)の塩および共沈剤とを一緒にして供することも可能である。

【0009】本発明はまた、以下の操作：

a) 血液成分にタンパク質分解酵素、検体希釈液、ならびに場合により塩および共沈剤を含む試薬を加えてインキュベートすることにより血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を分解、変性する；

b) さらにタンパク質変性溶解剤を加えて血液成分中のタンパク質、ウイルス由来タンパク質、その他の構成成分および混在物を可溶化する；そして

c) 有機溶媒による核酸抽出を行わずに、操作a)で塩および共沈剤を加えていない場合にはこの段階で両者を加え、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる血液成分からの核酸の抽出方法を提供する。

【0010】本発明の試薬キットを用いるウイルス核酸抽出は以下の手順で行う。

(a) タンパク質分解酵素によるタンパク質成分の分解、変性

(a-1) 血液成分にタンパク質分解酵素および検体希釈液を加える。

【0011】本発明における血液成分としては、血清、血漿を用いることができる。

【0012】タンパク質分解酵素としては、非特異的タンパク質分解酵素が好ましく、プロテイナーゼK、プロナーゼ、ズブチリシンなどが特に好ましい。酵素濃度としては、200ng/μl（血液成分）以上が好ましい。

【0013】本発明の検体希釈液は、還元剤、界面活性剤、キレート剤、タンパク質変性剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性の溶液である。還元剤としては、チオール系還元剤が好ましく、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどが特に好ましい。界面活性剤としては、上記検体希釈液中で沈殿を起こすおそれのないもの、または何らかの手段により再溶解可能なものである。ラウリル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40)およびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20)などが特に好ましい。キレート剤としては、二価の金属イオンをキレートしうる能力を有するものが好ましく、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩(EDTA-2Na)などが特に好ましい。また、タンパク質変性剤としては尿素が特に好ましい。これらのうちどれを使用するかは検体の

種類および得られる核酸の性質などに依存する。本発明の検体希釈液は弱酸性から弱アルカリ性で使用するが、pHが7～10が好ましい。

(a-2) 塩および共沈剤の添加

この段階で塩および共沈剤を添加しておくことができる。塩の種類としては塩化ナトリウム、塩化カリウムまたは酢酸ナトリウムなどが好ましい。共沈剤としては高分子多糖類が好ましく、グリコーゲンまたはデキストラ*

2-メルカプトエタノール	0.1-4%
N-ラウロイルサルコシナトリウム	0.1-2%
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩	1-100mM
尿素	4-10M
塩化ナトリウム	50-500mM
デキストラン (平均分子量 2,000,000)	10-200μg/1検体
トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)	50-400mM

上記の試薬はpHが弱酸性から弱アルカリ性水溶液で使用する、上記濃度の試薬混合物水溶液を血液成分(血清、血漿)100μlに対して100～1000μl添加することが好ましい。なお、この検体希釈液はタンパク質分解酵素の加水分解性能を高める、もしくは補助する効能を有している。また、上記試薬およびタンパク質分解酵素添加撹拌後、55℃前後で10分以上インキュベートを行うとよりいっそう上記試薬の効能が上がり、検体試料中のタンパク質成分の分解、変性効率が高められる。

【0015】また、後述するように、塩および共沈剤はこの段階で添加しても、あるいは後のアルコール沈殿の段階で添加してもよい。

(b) タンパク質変性溶解剤の添加

次いでタンパク質変性溶解剤を添加する。タンパク質変性溶解剤としては、カオトロップ剤が好ましく、グアニジン塩酸、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン硫酸塩などが特に好ましい。これらのタンパク質変性溶解剤は最終濃度が10～3000mMになるように添加するのが好ましい。

【0016】また、場合によりタンパク質変性溶解剤を添加、撹拌後に55℃前後で1分以上インキュベートを行うとタンパク質変性溶解剤の効能が一層高められる。

(c) アルカリ沈殿

この後、上記反応液にイソプロパノール、エタノールなどの低級アルコールを添加して核酸を析出沈殿させる。この操作をアルコール沈殿という。イソプロパノールを用いる場合は、好ましくはイソプロパノール最終濃度40%以上、エタノールを用いる場合は、エタノール最終濃度が70%以上になるように添加する。この際低級アルコール添加後に-70～4℃にて冷却し、塩析効果を高めることもできる。上記したように、この段階で塩および共沈剤を加えることも可能である。

【0017】次いで、好ましくは8,000<g以上、

*ンが特に好ましい。デキストランの平均分子量は500,000以上のものが特に好ましい。

【0014】ここで本発明の検体希釈液、ならびに塩および共沈剤の試薬成分の一例として好ましい濃度範囲を以下に示す(なお、以下の濃度は、デキストランを除いて検体希釈液中の濃度であり、塩および共沈剤も検体希釈液中に溶解した場合の濃度である)。

4℃で冷却遠心を行う。遠心分離時間は5分以上が好ましく、核酸は共沈剤と共に白色沈殿としてチューブ底に得られる。沈殿した核酸は遠心を行った後、上清をデカンテーションまたは吸引により取り除き回収する。

【0018】最後にアルコール沈殿して得られた核酸を70%エタノールで洗浄し、適当な溶液に再溶解して保存することにより使用可能な状態となる。

【0019】本発明の方法においては、ここまでのウイルス核酸抽出操作を1本のチューブ内で実施する。

【0020】本発明による上記の方法は、例えばフェノールクロロホルムで抽出した後、アルコール沈殿を行うなど従来の技術と組み合わせても使用可能である。

【0021】本発明の方法により抽出されたウイルス核酸が従来技術により抽出されたウイルス核酸と同等以上のものであることの確認は以下の項目により行うことができる。

(1) 逆転写反応

ウイルスがRNAウイルスで、抽出ウイルスゲノムがRNAである場合には、本発明の方法で抽出されたウイルス由来のRNAは抽出に用いたチューブのままで、RNAをcDNAに変換する逆転写酵素により逆転写反応を行うことができる。つまり本発明の方法により抽出されたRNAは逆転写反応を阻害するような物質を含んでいない高純度なものである。

【0022】上記逆転写反応で得られたcDNAは以下に述べる遺伝子増幅法により増幅し確認することができる。

(2) 抽出遺伝子の増幅(PCR)

本発明の方法により抽出されたウイルス核酸は、それがDNAであればそのまま、あるいはそれがRNAであればcDNAに変換の後、そのウイルスゲノムに特異的なプライマーを用いてPCRにより増幅することができる。通常PCR法は厳密な条件を必要とするが、本発明の方法により抽出されたウイルス核酸はこのPCR法を阻害するような不純物を含まない高純度なものである。

【0023】PCR法により増幅されたDNAは常法によりポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色により電気泳動像として確認することができる。

【0024】このように本発明の試薬キットおよび方法を用いて抽出されるウイルス核酸は、血液中のウイルスの存在確認、または定量など、ウイルスゲノムの研究、臨床分野に適用できる。また本発明の方法はウイルス以外にも組織、細菌、培養細胞、白血球などからの核酸抽出にも応用でき、本発明の抽出方法の応用範囲は極めて大きい。

【0025】以下に記載する実施例によって本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0026】

【実施例】

実施例1. ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムの抽*

トリス塩酸緩衝液(pH7.5)	200mM
2-メルカプトエタノール	2%
N-ラウロイルサルコシナトリウム	1%
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩	10mM
尿素	8M
塩化ナトリウム	200mM
デキストラン T-2000	0.0260%

(ファルマシア社製) 1. 5ml容チューブに検体血清100 μ lを取り、タンパク質分解酵素溶液15 μ l、検体希釈液385 μ lを添加した。検体数が多い場合は予め酵素溶液と検体希釈液を1検体当たりが上記の用量となるよう混合し、400 μ lずつ血清に添加することも可能である。攪拌後、55℃で30分間インキュベートした。次いでこのチューブにタンパク質変性溶解剤として8Mグアニジン塩酸溶液を250 μ l添加し、攪拌後55℃で15分間インキュベートした。さらにこのチューブにイソプロパノール600 μ lを添加し攪拌後、4℃で15分間静置した。12,000 \times g、4℃で遠心した後、上清を吸引により除去し、500 μ lの70%エタノールで2回洗浄し、同様に遠心後、上清を除去し10分間吸引乾燥した。ここまでの操作は全て1本のチューブ内で行った。

【0030】抽出後、得られたHBVゲノムDNAを30 μ lの精製水に再溶解し、そのうちの2.5 μ lを試料として用い、HBVゲノムのプレコア領域に特異的なプライマーを用いて遺伝子増幅を行った。これを1.5%アガロースゲルの電気泳動に付し、エチジウムブロマイド染色により検出した。この結果を図1に示す。

【0031】図から明らかなように、本発明の方法は、かなりコピー数の少ない試料からも効率よくHBVのDNAを抽出することができる。また、本発明の方法により抽出したHBVのDNAはPCRに十分使用できる高純度のものである。

* 出

本実施例では10⁸コピー/mlのHBVが含まれている血清を陰性血清により段階希釈し、10⁸~10³コピー/mlの希釈系列を作り、各希釈系列の血清を用いて以下のHBV-DNAの抽出を行った。

【0027】上記の各コピー数のHBVを含むヒト血清100 μ lを検体試料とし、使用チューブは容積が1.5mlのものを用了。

【0028】タンパク質分解酵素、検体希釈液、塩および共沈剤は以下の試薬、濃度で使用した。

・タンパク質分解酵素：20mg/mlプロテイナーゼK溶液(ベーリンガー・マンハイム社製)。

・検体希釈液(本実施例では検体希釈液に塩および共沈剤を添加して1つの溶液として使用した。以後の実施例においても検体希釈液は塩および共沈剤を含むものとする)を以下のように調製した。

【0029】

【0032】実施例2. ヒトC型肝炎ウイルス(HCV)ゲノムの抽出

本実施例では10⁸コピー/mlのHCVが含まれている血清を陰性血清により段階希釈し、10⁸~10³コピー/mlの希釈系列を作り、各希釈系列の血清を用いて以下のHCV-RNAの抽出を行った。

【0033】上記の各コピー数のHCVを含むヒト血清100 μ lを検体試料とし、使用チューブは容積が1.5mlのものを用了。

【0034】抽出方法および各試薬の種類、濃度は実施例1と同様に行った。

【0035】得られたHCVゲノムRNAに逆転写反応に必要な試薬20 μ lを添加し、同一チューブ内で逆転写反応を行った。

【0036】逆転写反応後、反応液5 μ lに対して、HCVゲノムのcDNAの5'-ノンコーディング領域に特異的なプライマーを用い増幅反応を行い、1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色により検出した。

【0037】なお、同じ検体をAGPC法(acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法、実験医学、Vol.9 No.15:99-102, 1991)の変法(共沈剤使用)にて抽出し、同様に検出を行い比較した。この結果を図2に示す。

【0038】図から明らかなように、本発明によりHCVのRNAの抽出から逆転写反応までを1本のチューブ

で行い、これをPCRに付した場合でも、かなりコピー数の少ない試料からも効率よくHCVのDNAを抽出することができる。

【0039】実施例3. 検出血清の使用量幅の検定
HCVを含むヒト血清（ 10^8 コピー／mlのHCV含有）1、10、50、100 μ lを検体試料とし、使用チューブは容積が1.5mlのものを用了。

【0040】抽出方法および各試薬の種類、濃度、用量および逆転写反応、cDNA増幅は実施例2と同様に行った。この結果を図3に示す。

【0041】図から明らかのように、いずれの検体試料を用いてもHCV-RNAの検出を容易に行うことができた。

【0042】なお、本発明の方法は血清、血漿などの血液成分からのウイルス核酸の抽出に使用できるのみならず、全血からのゲノムDNAの抽出にも使用できる。これを以下の参考例に示す。

参考例1. ウシ血液からのゲノムDNAの抽出

ウシ全血2ml（EDTA採血）をチューブに取り、RCLB（Red Cell Lysis Buffer 20r）（0.32Mシュクロース、1%（v/v）ポリ*

*オキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル、5mM塩化マグネシウム、12mMトリス塩酸緩衝液）を4ml加え、氷上でよく混和し、2,000 \times g、4℃で5分間遠心分離して上清を除去した。次にRCLBを2ml加えて混和し、同様に遠心分離、上清除去を行った。この操作をもう一度行った。得られた沈渣に検体希釈液590 μ l（実施例1と同じく検体希釈液に塩を溶解した。但し本参考例では共沈剤は添加していない）、タンパク質分解酵素（20mg/mlプロテイナーゼK）10 μ lを加え、時折混和しながら55℃で30分間インキュベートし、沈渣を完全に溶解させた。さらに、タンパク質変性溶解剤として8Mグアニジン溶液を50 μ l添加し混和した後、55℃で15分間インキュベートした。最後にイソプロパノールを600 μ l加え、DNAを析出分離した後、70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥して精製水300 μ lに再溶解した。抽出したウシゲノムDNA溶液を吸光度測定し、純度および収量を検討した。

【0043】結果を以下の表1に示す。

【0044】

表1

ウシゲノムDNAの抽出結果（25倍希釈で測定）

サンプルNo.	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	収量（ μ g/2ml血液）
1	0.1749	0.0960	1.822	65.6
2	0.1120	0.0587	1.908	42.0

【発明の効果】本発明によって、フェノール、クロロホルムなど有機溶媒を用いる方法などの従来の方法よりも短時間で、しかも安全に高純度のウイルス核酸を得ることができる。しかも、使用チューブが1本で済み、経済的である上に、ウイルス核酸を研究する上で最も注意を要するコンタミネーションの危険性を低減できる。このような本発明の効果は多数の血液検体中のウイルスを検出する場合には特に有用である。

【0045】また、本発明の方法によって抽出、精製されたウイルス核酸は、逆転写反応、遺伝子増幅技術に対応できるなど、各種遺伝子工学、ウイルス学などの材料として十分に使用可能なものであり、その応用分野は極めて広い。

【図面の簡単な説明】

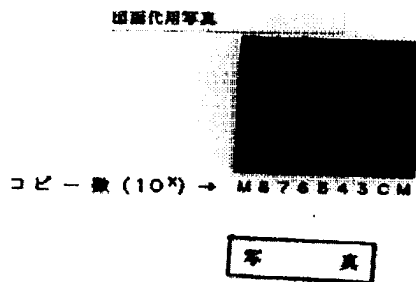
※40

※【図1】本発明の方法により抽出したHBV-DNAを用いてPCR法により増幅した結果を示すアガロースゲル電気泳動の図である。図中、Mはマーカー（pBR322 HaeIII Digest）であり、Cは陰性血清100 μ lから抽出したコントロールである。

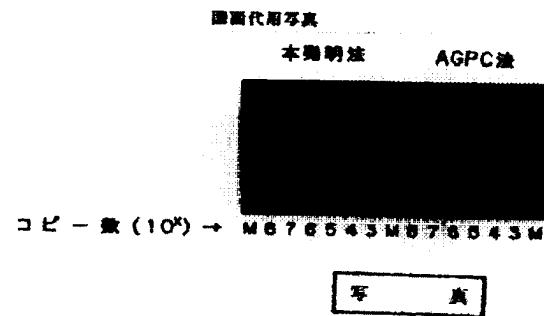
【図2】本発明の方法により抽出したHCV-RNAから逆転写反応によりcDNAを調製し、PCR法により増幅した結果を、AGPC法と比較して示すアガロースゲル電気泳動の図である。図中、Mはマーカー（pBR322 HaeIII Digest）である。

【図3】検体血清の使用量幅の検定の結果を示す図である。図中、Mはマーカー（pBR322 HaeIII Digest）であ。

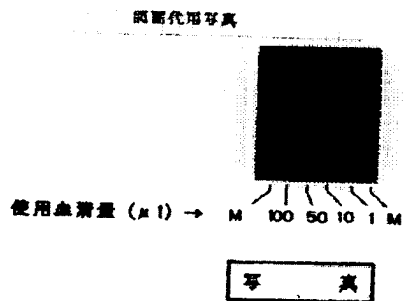
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成6年7月1日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により抽出したHBV-DNAを用いてPCR法により増幅した結果を示すアガロースゲル電気泳動の写真である。図中、Mはマーカー（pBR

322 HaeIII Digest）であり、Cは陰性血清100μlから抽出したコントロールである。

【図2】本発明の方法により抽出したHCV-RNAから逆転写反応によりcDNAを調製し、PCR法により増幅した結果を、AGPC法と比較して示すアガロースゲル電気泳動の写真である。図中、Mはマーカー（pBR322 HaeIIIDigest）である。

【図3】検体血清の使用量幅の検定の結果を示す電気泳動の写真である。図中、Mはマーカー（pBR322 HaeIII Digest）である。